

**SUBSTRATE ZUR BESTIMMUNG DER CHOLINESTERASE-
AKTIVITÄT UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DER IN VITRO-REAKTIVIERUNG MIT 2-PAM UND TOXOGONIN**

von

Hanns-Joachim Urbach

aus Dresden

1971 # 220

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität
Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

SUBSTRATE ZUR BESTIMMUNG DER CHOLINESTERASEAKTIV-
TÄT UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DER IN VITRO-REAKTIVIERUNG MIT 2-PAM UND TOXOGONIN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Hanns-Joachim Urbach
aus Dresden

Erlangen 1971

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Schiefer

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Koreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 20.4.1971

Inhaltsverzeichnis

A) Einleitung	5
I. Hemmung der Cholinesterasen durch organische Phosphorsäureester	5
II. Veränderte Aktivitäten anderer Genese	5
a) Erhöhte Werte	6
b) Erniedrigte Werte	6
III. Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Alkylphosphatvergiftung und niedrigen Serumcholinesteraseaktivitäten anderer Ursache	8
B) Problemstellung	9
C) Methoden zur Serumcholinesteraseaktivitätsmessung unter Verwendung von Nichtcholinestern	12
I. Phenylbenzoat	12
II. Indoxylacetat	14
III. Naphthylacetat	15
IV. Indophenylacetat	15
V. Thiolessigsäure	16
VI. Carbonaphthoxycholin	18
VII. Essigsäureanhydrid	19
VIII. Acetylsalicylsäure	21
IX. Acetylthiocholin	22
X. Butyrylthiocholin	25

D) Experimenteller Teil	26
I. Aktivitätsbestimmungen für normales Serum	27
II. Ansätze mit verschiedenen 2-PAM- und Toxogoninkonzentrationen ohne Serum	29
III. Ansätze mit Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin	34
IV. Ansätze mit vergiftetem Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin	35
E) Diskussion	39
F) Zusammenfassung	50
G) Literaturverzeichnis	52

A) Einleitung

I. Hemmung der Cholinesterasen durch organische Phosphorsäureester

Die Giftwirkung organischer Phosphorsäureester wie E 605 besteht in der Blockierung der Cholinesterasen im Zentralnervensystem und in den motorischen Endplatten. Der Weg dieser Substanzen vom Ort der Resorption ins Gewebe führt aber über das Blut. So liegt bereits eine Hemmung der Serumcholinesterase von mindestens 80 % vor, ehe die ersten klinischen Symptome auftreten (Schulze 1960; Zacks und Blumenberg 1964). Daraus ergibt sich die große Bedeutung der Aktivitätsmessung dieses Ferments zum Nachweis von Alkylphosphatvergiftungen nicht nur für die Klinik, sondern auch für die forensische Medizin.

II. Veränderte Aktivitäten anderer Genese

Die Serumcholinesteraseaktivität ist zwar für den einzelnen Menschen relativ konstant, weist aber eine große individuelle Streubreite auf, bedingt durch den genetischen Polymorphismus, durch Veränderungen während einer Anzahl von Krankheiten und durch Hemmung durch viele andere Pharmaka und Gifte.

a) Erhöhte Werte

Vermehrte Aktivität findet sich bei Nephropathien, die mit Albuminurie einhergehen (Kaufman 1954). Wegen seines größeren Molekulargewichts, es wandert bei der Elektrophorese zwischen der α_2 - und β -Fraktion der Globuline (Augustinsson 1959), wird das Fermentprotein nicht wie die Albumine ausgeschieden (Sailer und Braunstainer 1959). Ebenfalls erhöhte Serumcholinesterasewerte findet man bei gesteigertem Leberstoffwechsel, wie z.B. beim Vorliegen einer Leberzellverfettung (Weber 1966). Als Bildungsort wird nämlich die Leber angenommen (Kaufman 1954).

b) Erniedrigte Werte

Verminderte Aktivität tritt bei allen Leberparenchymerkrankungen, sowie Leiden, die sekundär eine Leberschädigung oder Hypoproteinämie zur Folge haben, auf, z.B. bei chronischen Entzündungen wie primär chronischer Polyarthrit, Tuberkulose und Bronchitiden, Verschlusßikterus, chronischen Kardiopathien mit Leberstauung, Morbus Hodgkin (Sailer und Braunstainer 1959), akuter Hepatitis, dekompensierter Lebercirrhose, Plasmocytom, Myelose und Karzinom (Lang und Intsesuloglu 1962).

Neben ausgesprochenen Giften stehen eine Reihe von Pharmaka, die eine mehr oder weniger stark hemmende Wirkung auf die Cholinesteraseaktivität ausüben: Lyser, säurederivate, Kresylphosphate,

Narkotika, Hypnotika, Histamin, Antihistaminika, Morphin, Chinin, Ergotamin, Novocain, Natrium-salicylat, Muskelrelaxantien, Phenothiazine, Physostigmin, Prostigmin (Friedberg und Sakai 1958), Atropin, Cocain, Hordenin und Muscarin (Keeser 1938).

Außer der normalen Pseudocholinesterase (Serumcholinesterase) sind eine Reihe genetisch bedingter Varianten mit geringerer Aktivität bekannt: die intermediären und atypischen Serumcholinesterasen (Harris und Robson 1963; Goedde und Mitarb. 1964; McComb und Mitarb. 1965; Simpson und Kalow 1965; Wetstone und Mitarb. 1965; Goedde, Doenicke und Altland 1967).

Mitunter wurde sogar das völlige Fehlen jeglicher Aktivität beobachtet (Lidell und Mitarb. 1962). Klaus und Renschler (1960) berichteten über einen Fall von essentieller Hypocholinesterasämie bei einem klinisch Gesunden mit nur 7-8 % der Normalaktivität. Die Autoren vermuteten auch hier, das Fehlen aktiver Serumcholinesterase und führten die geringe, von ihnen gemessene Substratspaltung auf andere Fermente zurück.

Die Serumcholinesterase scheint demnach nicht lebensnotwendig zu sein, und es stellt sich die Frage nach ihrer physiologischen Funktion. Während Clitherow, Mitchard und Harper (1963) ihre Aufgabe darin sahen, nichtacetyl-Cholinester mit toxischer Wirkung wie z.B. Butyrylcholin zu spal-

ten, hielten es Funnell und Oliver (1965) für möglich, daß sie das freie Cholin im Plasma reguliert.

III. Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Alkylphosphatvergiftung und niedrigen Serumcholinesteraseaktivitäten

Da unter diesen Umständen die Aktivitätsbestimmung allein nicht den Schluß auf eine Alkylphosphatvergiftung zuläßt, schlugen Friedberg und Sakai (1958) die Verwendung eines Reaktivators und die Bestimmung der Reaktivierbarkeit vor. Sie arbeiteten nach der manometrischen Methode von Ammon mit der Warburg-Apparatur, Acetylcholin als Substrat und 2-PAM* als Reaktivator. Sucker (1966) ging nach der kolorimetrischen und der elektrometrischen Methode vor und verwendete ebenfalls Acetylcholin und 2-PAM.

Allerdings ist bei einem derartigen Verfahren auch die Zeitspame zwischen Vergiftung und Messung zu berücksichtigen. Durch "ageing" wird das gehemmte Ferment in eine nicht reaktivierbare Form überführt, d.h. es tritt eine mit der Zeit fortschreitende Verminderung der Reaktivierbarkeit ein (Jandorf und Mitarb. 1955; Wilson 1955; Hobbiger 1956). Berends und Mitarbeiter (1959) fanden, daß die Dialkylphosphor-Enzymverbindung in eine nicht reaktivierbare Monoalkyl-Phosphor-Enzymverbindung gespalten wird. Sie arbeiteten

* 2-Pyridinaldoximmethyljodid

mit Pferdeserum und Diisopropylfluorophosphat und wiesen in vitro nach, daß die durch "ageing" entstandene Menge an Isopropanol dem Verlust an Reaktivierbarkeit proportional war. Bei Lagerung des vergifteten Serums bei 24°C war nach acht Stunden nur noch eine 26 %-ige Wiederherstellung der Aktivität durch 2-PAM möglich.

B) Problemstellung

Verwendbarkeit von Nichtcholinestern als Substrate für Reaktivierungsmessungen alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase mit 2-PAM und Toxogonin*

Da der Nachweis von Vergiftungen mit Cholinesteraseblockern vom Typ der organischen Phosphorsäureester nicht nur für die forensische Medizin von Bedeutung ist, sondern in gleichem Maße auch für die Klinik - hier ist neben dem Nachweis vor allem die Verlaufskontrolle einer Antidottherapie wichtig - wäre es wünschenswert, wenn neben den bereits erwähnten, komplizierten Verfahren auch einfachere zur Verfügung stünden, die in jedem gut eingerichteten Kliniklabor durchgeführt werden könnten.

Augustinsson (1948) gab in seiner Monographie über die Cholinesterasen eine Aufstellung der Substanzen, die durch die Cholinesterasen hydrolysiert werden. Da die Substratspezifität der Pseudocholin-

* Bis-(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridiniummethyl-äther)dichlorid

esterase weiter gefaßt ist, als die der Acetylcholinesterase, reagiert sie mit vielen Cholin- und Nichtcholinestern, sodaß eine große Anzahl von Substraten zur Aktivitätsmessung Verwendung finden kann. Es handelt sich hierbei vor allem um Ester von Merkaptanen und aromatischen Alkoholen, deren Spaltstücke zum Teil sehr leicht quantitativ zu erfassen sind.

Geldmacher-von Mallinckrodt und Kaiser (1968) prüften die Verwendbarkeit des Verfahrens nach Main, Miles und Braid (1961) für Reaktivierungsmessungen und fanden, daß das Substrat o-Nitrophenylbutyrat nicht geeignet ist, da es bereits durch 2-PAM allein gespalten wird. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß sich o-Nitrophenylbutyrat nicht wie ein Ester, sondern wie ein Anhydrid verhält und führten eine Reihe von ähnlichen Reaktionen auf, bei denen Anhydride und Organophosphate durch stickstoffhaltige Verbindungen hydrolysiert werden:

So die Beschleunigung der Hydrolyse von Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Diäthylfluorophosphat durch Imidazol, Histidin und Pyridin, wobei es sich bei der Reaktion von DFP mit Histidin und Imidazol um eine echte Katalyse handelte (Wagner-Jauregg und Hackley 1953). Jandorf (1956) fand, daß der Zerfall von Methylisopropylfluorophosphat (Sarin) bei pH 7,5 schneller verlief, wenn Hydroxylamin zugegen war. Eine schnellere Hydrolyse von Sarin wird auch durch Oxime (Green und Saville 1956) und durch einige

Hydroxamsäuren (Wagner-Jauregg 1956) bewirkt. Letztere beeinflussen auch den Zerfall von DFP, Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) und Tabun (Green, Sainsbury, Saville und Stainsfield 1958). Die Beschleunigung der Spaltung von Phosdrin durch Hydroxylamin beobachteten Gatterdam, Casida und Stoutamire (1959). Hackley, Plapinger, Stolberg und Wagner-Jauregg (1955) zeigten, daß zur Freisetzung von einem Mol Fluorwasserstoff aus DFP 1,5-2 Mol Hydroxamsäuren verbraucht wurden. Werner und Piguet (1903) stellten fest, daß Benzinmonoxim die Spaltung von Benzolsulfonsäure bewirkt, und Hurd und Bauer (1954) beschrieben die Reaktion von p-Toluolsulfonylchlorid mit Benzhydroxamsäure, wobei O-Phenylcarbamylbenzohydroxamat entstand. Hackley, Plapinger, Stolberg und Wagner-Jauregg (1955) nahmen hierfür denselben Reaktionsmechanismus an wie bei der Hydrolyse von DFP, da dabei dasselbe Reaktionsprodukt gebildet wurde. Die Freisetzung von Essigsäure aus Essigsäureanhydrid unter Mitwirkung von Hydroxyiminoaceton beschrieben Green und Saville (1956).

Im Folgenden sollen nun Substanzen, die einerseits als Substrate für Cholinesterasen verwendet wurden, deren säureanhydridartige Struktur jedoch andererseits eine Reaktion mit 2-PAM und Toxogonin wahrscheinlich erscheinen läßt, zusammengestellt und die Verfahrensweisen zur Aktivitätsbestimmung beschrieben werden.

2) Methoden zur Serumcholinesterase-Aktivitätsmessung
unter Verwendung von Nichtcholinestern

1. Phenylbenzoat

Rider, Moeller und Du Bois (1951) führten Überwachungen von Personen, die mit Anticholinesterasen behandelt wurden, nach der von ihnen modifizierten Gomori-Methode durch.

Die Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität mit Phenylbenzoat nach Rider, Moeller und Du Bois (1951)

Prinzip:

Das während der enzymatischen Hydrolyse freiwerdende Phenol reagiert mit einem Diazosalz und wird kolorimetrisch gemessen.

Reagentien:

Phenollösung: 1 ml wässriger Phenollösung enthält 100 µg Phenol.

Boraxlösung, gesättigt: 35 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ werden zu 1 Liter 15 %-igem Äthanol gegeben und 24 Stunden stehengelassen.

Indikatorlösung: 0,25 g Du Pont Naphthanil Diazo Rot B Salz werden in 100 ml eiskaltem Wasser gelöst. Anschließend filtrieren.

Phosphatpuffer: 5,55 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ und 7 g NaH_2PO_4 werden in 1 Liter Wasser gelöst.

Substrat-Stammlösung: 2 g Phenylbenzoat werden ad 100 ml mit Methanol aufgefüllt.

Substrat-Pufferlösung: Zu 500 ml Puffer wird 1 ml Substrat-Stammlösung gegeben.

Serumverdünnung: 1 ml Serum wird zu 100 ml mit Wasser verdünnt.

Arbeitsweise:

Aufstellen der Eichkurve:

Von der Phenollösung werden Verdünnungen hergestellt, die 2,5 bis 25 μg Phenol in 6 ml enthalten. Zu 2 ml jeder dieser Verdünnungen werden 4 ml der Boraxlösung und 0,5 ml der Indikatorlösung gegeben. Die Ansätze werden gemischt, in Küvetten überführt und nach 10 Minuten erfolgt die Messung in einem Klett-Summerson Colorimeter mit Blaugrünfilter Nr. 50.

Aktivitätsmessung:

1 ml des verdünnten Serums und 5 ml der Substrat-Pufferlösung werden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird die Probe in Eiswasser gestellt, 4 ml Borax- und 0,5 ml Indikatorlösung werden zugegeben, und die Messung erfolgt wie bei der Herstellung der Eichkurve. angegeben.

Als Vergleichswert dient ein Ansatz, der dem obigen gleicht, nur daß das Serum erst zugegeben wird, nachdem das Gemisch im Eiswasser ist.

11. Indoxylacetat

Barnet und Seligman (1951) führten Indoxylacetat als Substrat zur histochemischen Darstellung von Cholinesterasen ein. In der Folgezeit wandten eine Reihe von Autoren dieses Substrat an, da es hierbei keiner Indikatoren bedarf, und das Reaktionsprodukt sowohl in Wasser, als auch in Lipoiden unlöslich ist und daher nicht diffundiert (Barnet 1952; Holt 1952; Holt und Withers 1952; Holt 1956; Hobbiger 1957; Underhay 1957).

Aus Indoxylacetat wird durch Cholinesterasen Essigsäure abgespalten und zwei Mol Indoxyl werden durch Luftsauerstoff zu einem Mol Indigo oxydiert.

Günther und Ruff-Sondermeier (1965) bestimmten mit Indoxylacetat die Dibucainzahl, gaben zwar die Methodik nicht näher an, beriefen sich jedoch auf die Arbeiten von Uriel (1961) und Cotson und Holt 1958.

In Anlehnung an Uriel (1961) ergibt sich folgende Vorschrift:

5 mg Indoxylacetat werden in 0,5 ml Aceton gelöst und sofort in 22 ml Veronalpuffer pH 8,2 gegeben. Die Lösung ist innerhalb von 8 Stunden zu verwenden. Die Meßzelle enthält 2 ml Puffer-Substrat-Acetongemisch und 0,1 ml Serum. Das Absorptionsmaximum liegt bei 667 nm.

III. Naphthylacetat

Nachlas und Seligman (1949) verwendeten als erste Naphthylacetat in der Histochemie zum Esterasenachweis und viele Autoren folgten später diesem Vorgehen (Gomori 1952; Denz 1953; Gomori 1955; Underhay 1957; Augustinsson 1959; Davis 1959). Das abgespaltene Naphthol wird dabei mit einer Diazoverbindung unter Bildung eines Azofarbstoffs gekoppelt.

Serumcholinesterasebestimmung nach Uriel (1961)

5 mg β -Naphthylacetat werden in 0,5 ml Aceton gelöst und zusammen mit 1 mg Echtblausalz in 25 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 gegeben.

Der Ansatz enthält 0,1 ml Serum, 1 ml Puffer-Substrat-Indikatorlösung und Puffer ad 2 ml. Die Messung erfolgt spektrophotometrisch, das Absorptionsmaximum liegt bei 515 nm.

IV. Indophenylacetat

Kramer und Gamson (1958) gaben eine Methode zur Acetylcholinesterasebestimmung unter Verwendung von Indophenylacetat an. Das Substrat wird jedoch auch durch Pseudocholinesterase gespalten (Kramer und Gamson 1960). Ein Indikator ist nicht notwendig, da das Reaktionsprodukt selbst gefärbt ist und sein Erscheinen spektrophotometrisch verfolgt werden kann.

Acetylcholinesterasebestimmung nach Kramer und Ganston (1958)

Reagentien:

Clark und Lubs- Puffer; pH 8: 46,8 ml 0,1 N Natriumhydroxidlösung und 50 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung werden ad 100 ml aufgefüllt.

Enzym: Rindererythrocytencholinesterase

Substratlösung: 0,375 g gereinigtes Indophenylacetat werden in Äthylalkohol aufgelöst und ad 25 ml aufgefüllt. 0,2, 0,5, 1,0 oder 2,0 ml dieser Lösung werden ad 5 ml verdünnt.

Arbeitsweise:

Die Reaktionsmischung mit Puffer, Ferment und Substrat werden in ein Wasserbad von $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ gebracht.

Das Reaktionsgemisch enthält 0,1 ml Indophenylacetatlösung und Acetylcholinesterase ad 10 ml mit Puffer aufgefüllt.

Die Messung erfolgt nach 15 minütiger Inkubationszeit bei 20°C in 10 mm Corex-Küvetten mit einem Beckman DU Spektrophotometer bei 625 nm.

Als Vergleichswert dient ein Ansatz ohne Enzym.

V. Thiolessigsäure

Wilson (1951) wies während seiner Studien über die Acylierung des Enzyms auf die Spaltung von Thiolessigsäure in Essigsäure und Schwefelwasserstoff durch Acetylcholinesterase hin. Sowohl

das Substrat als auch das Reaktionsprodukt Schwefelwasserstoff werden durch Jod oxydiert. Letzteres verbraucht jedoch doppelt soviel Jod pro Mol. Dadurch läßt sich die Reaktion titrimetrisch verfolgen. Wilson arbeitete mit Acetylcholinesterasepräparationen aus dem elektrischen Gewebe von *Electrophorus electricus*.

Crevier und Bélanger (1955) verwendeten Thiolessigsäure in der Histochemie und wiesen die Sulfhydrylgruppen durch Bleionen nach.

Cholinesterasebestimmung nach Wilson (1951)

Reagentien:

Puffer: 0,3 M Phosphatpuffer

Substratlösung: 0,23 M Thiolessigsäurelösung

Enzymlösung: Gereinigte Präparation von Acetylcholinesterase aus dem elektrischen Gewebe von *Electrophorus electricus*.

Jodlösung: $7,4 \times 10^{-3}$ N J_2^- (0,2 M KJ)

Acetatpuffer: 1 M, pH 4,5

Prostigminlösung: 0,1 M

Thiosulfatlösung: $8,0 \times 10^{-3}$ N

Arbeitsweise:

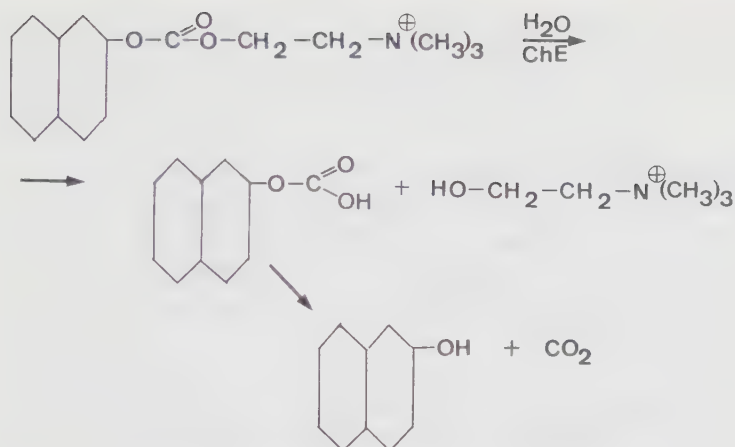
In ein Glas werden 0,1 ml Substratlösung, 0,1 ml Enzymlösung und Phosphatpuffer gegeben. Der Kontrollwert enthält Wasser statt des Ferments. Nach halbstündiger Inkubationszeit werden zwei Tropfen

Prostigminlösung und 4 Tropfen Acetatpuffer dem Reaktionsgemisch und dem Kontrollwert zugefügt. Eine Minute später gibt man beide Ansätze in je einen Erlenmeyerkolben mit 7,50 ml Jodlösung zur Rücktitration des überschüssigen Jods mit Thio-sulfat.

VI. Carbonaphthoxycholin

Ravin und Mitarbeiter (1951) bestimmten die Ser-
umcholinesterase mit Carbonaphthoxycholin. Wäh-
rend der Hydrolyse entstand β -Naphthylsäure, die
spontan zu β -Naphthol decarboxylierte, das durch
Reaktion mit einer Diazoverbindung nachgewiesen
wurde.

Erdös und Debay (1960) verfolgten die enzymati-
sche Spaltung dieses Substrats durch Cholinase (Prä-
paration konzentrierter, gereinigter Serumcholin-
esterase aus den Cutter Laboratorien) ohne Verwen-
dung eines Indikators. Sie beobachteten während
des Vorgangs zunehmende Absorption mit einem Maxi-
mum bei 3275 Å. Die Verfasser erhielten ein UV-
Absorptionsspektrum, das mit dem eines Ansatzes
identisch war, der β -Naphthol, Phosphatpuffer,
Cholinase und 1×10^{-4} M KJ enthielt.



Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität nach Erdös und Debay (1960)

Puffer: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,3

Substratlösung: 5×10^{-4} M Carbonaphthoxycholinlösung in 0,5 %-igem Aceton. (Die Acetonkonzentration im Reaktionsgemisch ist geringer als 1 %.)

Enzym: Serum in einer Endverdünnung von 1 : 50.

Routinemäßige Messungen wurden von den Autoren bei $3250 \text{ \AA}$ ausgeführt (Maximum bei $3275 \text{ \AA}$).

VII. Essigsäureanhydrid

Wilson (1952) verfolgte die Spaltung von Essigsäureanhydrid durch Acetylcholinesterase aus dem elektrischen Organ von *Electrophorus electricus* durch die Bestimmung des unverbrauchten Substrats

nach der Methode von Hestrin (1949). Die Spontanhydrolyse betrug nach seinen Angaben weniger als 20 %.

Bergmann, Wurzel und Shimoni (1953 a, b) gelang jedoch wegen der erheblichen Spontanhydrolyse keine exakte Messung, wenn das Substrat in wässriger Lösung vorlag. Auch Hestrin machte in seiner Arbeit (1949) nur Angaben über Benzoe-, Bernstein- und Phthalsäureanhydrid.

Bergmann und Mitarbeiter (1953) entwickelten daher eine Zweiphasentechnik, bei der das Anhydrid zur Vermeidung des spontanen Zerfalls zunächst in organischem Medium gelöst wurde. Die Messung erfolgte mit der Warburg-Apparatur.

Zweiphasentechnik zur Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität mit Anhydriden nach Bergmann, Wurzel und Shimoni (1953 b)

Die Autoren arbeiteten mit Acetylcholinesterase aus dem elektrischen Organen von *Electrophorus electricus* und *Torpedo marmorata*.

Die Pufferlösung (pH 7,5) enthält 0,1 M NaCl, 0,026 M NaHCO_3 und 0,04 M MgCl_2 .

Essigsäureanhydrid wird 1 : 100 mit Toluol verdünnt.

Die Gasphase besteht aus 95 % Luft und 5 % CO_2 .

Arbeitsweise:

0,2 ml Substratlösung werden in den Seitenarm des

Warburggefäßes gegeben. Das Hauptgefäß enthält 2,9 ml gepufferte Enzymlösung, bzw. für den Leerwert nur 2,9 ml Puffer. Um jedoch schnell eine konstante Manometereinstellung zu erreichen, empfehlen die Autoren, auch in das Hauptgefäß etwa 0,02 ml Toluol zu geben. Die Temperatur beträgt 23°C. Zum Zeitpunkt Null wird der Inhalt des Seitenarms in das Hauptgefäß gekippt.

Eine gewisse Schwierigkeit in der quantitativen Auswertung ergibt sich aus der Tatsache, daß die Anhydridkonzentration in der organischen Phase in der Gegenwart von Enzym schneller abnimmt als im Leerwert, d.h., daß die absoluten Konzentrationen, die sich als Gleichgewicht zwischen beiden Phasen einstellen, nur im Zeitpunkt Null gleich sind. Es dauert gewöhnlich einige Minuten bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Daher kann manchmal beobachtet werden, daß die enzymatische Hydrolyse zu Beginn größer ist.

VIII. Acetylsalicylsäure

Bereits Augustinsson (1950) beschäftigte sich mit der Spaltung von Acetylsalicylsäure durch Acetylcholinesterase. Hofstee (1951) gab ein Verfahren zur Bestimmung der Serumcholinesterase mit diesem Substrat an.

Die Serumphosphorylcholinesterasebestimmung nach Hofstee (1951)

Die Substratlösung wird vor jedem Experiment frisch angesetzt, indem die Acetylsalicyllsäure mit einigen Tropfen Alkohol bis zur Lösung erhitzt und dann mit 0,075 M Veronalpuffer pH 8, dem eine dem Substrat äquivalente Menge 1 N NaOH zugegeben ist, versetzt wird.

Die Meßzelle enthält 0,025 ml Serum, Puffer-Substratlösung und Wasser zu einem Endvolumen von 3 ml. Die Endkonzentration des Esters beträgt $1,66 \times 10^{-5}$ M. Der Leerwert enthält nur Puffer-Substratlösung und Wasser. Die Messung erfolgt bei 300 nm. Die Spontanhydrolyse braucht nicht berücksichtigt zu werden, da sowohl Meß- als auch Kontrollwert das Substrat in gleicher Konzentration enthalten.

IX. Acetylthiocholin

Koele und Friedenwald (1949) führten Acetylthiocholin als Substrat zur histochemischen Darstellung von Cholinesterasen ein. Das durch die enzymatische Spaltung freiwerdende Thiocholin wurde als Kupfer-Thiocholin nachgewiesen. Da sich herausstellte, daß die Thioanalogen der Cholinester schneller als die Cholinester selbst gespalten werden und sich Thiocholin mit Hilfe einer Reihe von Indikatoren leicht qualitativ als auch quantitativ bestimmen läßt, wurden diese Verbindungen als Substrate zahlreicher Methoden in

der Histochemie und zur Bestimmung der Erythrozyten- und der Serumcholinesterase verwendet.

Tabachnick (1956), Gal und Roth (1957), Tabachnick und Mitarbeiter (1958) und Rubin und Mitarbeiter (1967) bestimmten die Extinktionsabnahme der Thioesterbindung im UV-Bereich ohne Verwendung eines Indikators. Wilson (1952) und Meyer und Wilbrandt (1954) verfolgten die Hydrolyse jodometrisch. Methoden von Meyer und Wilbrandt (1954) und Gal und Roth (1957) beruhen auf der Reaktion der Thiocholin-Komponente mit Dichlorphenolindolphenol und McOsker und Daniel (1959) verwendeten die Nitroprussid-Reaktion. Garry und Routh (1955), Ellman und Mitarbeiter (1961), Weber (1966) und Knedel und Böttger (1967) ließen Thiocholin mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure reagieren.

Serumcholinesterasebestimmung nach Weber (1966)

Diese, auf den Arbeiten von Garry und Routh (1955) und Ellman und Mitarbeitern (1961) beruhende Methode hat wegen ihrer Einfachheit und Genauigkeit weite Verbreitung in der Klinik gefunden.

Prinzip:

Die Pseudocholinesterase des Serums spaltet Acetylthiocholinjodid. Die dabei freiwerdenden Sulfhydryl-Gruppen reagieren mit 5,5'-Dithio-

is-2-nitrobenzoesäure stöchiometrisch unter Bildung einer intensiv gelben Farbe, mit Absorptionsmaximum bei etwa 405 nm.

Chemikalien:

Tris puriss. p. a. (HG 121,14), z.B. Fluka Acetylthiocholinjodid puriss. (HG 299,19), z.B. Fluka 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure, Sigma cv. Glutathion, HG 307, Boehringer; nur für Standard notwendig.

Herstellung der Reagentien:

Trispuffer, pH 7,4; 50 mM: 6,06 g Tris in etwa 900 ml Aqua bidest. lösen, pH mit 1 N Salzsäure auf genau 7,4 einstellen. Mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen. Bei 4°C Monate haltbar.

Tris-DTNB-Puffer, pH 7,4: 20 mg DTNB in 200 ml Trispuffer, pH 7,4 unter ständigem Rühren lösen. Bei 4°C viele Wochen haltbar.

Acetylthiocholinjodid-Lösung, 55 mM: 320 mg Acetylthiocholinjodid in 20 ml Aqua bidest. lösen. Bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

Glutathionlösung, 1 mM: 50,7 mg Glutathion in 100 ml Aqua bidest. lösen. Diese Lösung wird nur zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten benötigt. Für die Durchführung von Routineanalysen ist sie zu entbehren.

Arbeitsweise:

Die Durchführung der Messung ist einfach. Die Reaktion erfolgt in einer thermostabilen Küvette bei 25°C. Ein Leerwert wird nicht benötigt, da die Extinktionszunahme gemessen wird.

Tris-DTNB-Puffer 0,2 ml

Serum 0,02 ml

gut mischen und einige Minuten bei 25°C vorinkubieren. Start der Reaktion mit 0,2 ml Acetylthiocholinjodidlösung.

Extinktionszunahme während etwa 20-30 Sekunden bei 405 nm registrieren. Die Berechnung der Aktivität in Einheiten erfolgt mit Hilfe einer Zeit-Aktivitätstabelle.

X. Butyrylthiocholin

Ein durch Einfachheit und Schnelligkeit bestechendes Verfahren zur Serumcholinesterasebestimmung mit Butyrylthiocholin wurde von der Firma Merck als fertige Testkombination auf den Markt gebracht. Die Methode beruht auf den Arbeiten von Garry und Routh (1955), Weber (1966) und Knedel und Böttger (1967). Als Indikator für Thiocholin wird 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure verwendet.

Der kinetische Cholinesterasetest der Firma Merck (Merckotest)

Alle erforderlichen Chemikalien sind in Pulverform im Testglas enthalten:

0,02 M Phosphatpuffer pH 7,7

0,006 M S-Butyrylthiocholinjodid

0,25 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure

Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Endwert unmittelbar vor der Messung.

Arbeitsvorschrift:

2 ml Aqua bidest. und 0,01 ml Serum werden in das Testglas pipettiert. Nach kräftigem Schütteln wird der Inhalt in eine 10 mm Küvette gefüllt. Als Standard wird Wasser verwendet. 30 bis 60 Sekunden später beginnt die Messung, indem die Zeit gestoppt wird, in der die Extinktion bei 405 nm um 0,1 zunimmt. Die Berechnung der Enzymaktivität in Einheiten erfolgt nach einer der Packung beigegebenen Tabelle.

2) Experimenteller Teil

Untersuchungen zur Verwendbarkeit von Butyrylcholin als Substrat für Reaktivierungsmessungen alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase mit 2-PAM und Toxogonin

Von den genannten Verfahren wurde der kinetische Cholinesterasetest der Firma Merck mit Butyrylcholin als Substrat hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber 2-PAM und Toxogonin geprüft.

Reagentien und Arbeitsweise siehe Seite 25 und 26.

Die Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur in einem Zeiss Photometer. Um den Reaktionsablauf länger verfolgen zu können, wurden wegen der grossen Reaktionsgeschwindigkeit, besonders für Toxogonin, statt 10 mm Küvetten solche mit 5 mm Schicht-

dicke verwendet.

Zunächst wurde die Bedeutung der Spontanhydrolyse des Substrats für das vorliegende System geprüft, indem dem Testglas 2 ml Aqua dest. zugefügt wurden.

Die Extinktionszunahme betrug im Mittel 0,001 in 11 Minuten.

Bei allen im Folgenden beschriebenen Experimenten begannen die Messungen der Empfehlung des Herstellers entsprechend ca. 60 Sekunden nach Beginn der Reaktionen. Der zeitliche Verlauf der Substratspaltung wurde verfolgt, indem jeweils die Zeit registriert wurde, wenn die Extinktion bei 405 nm um 0,1 zugenommen hatte.

I. Aktivitätsbestimmungen für normales Serum

Frisches Venenblut wurde ohne Zusatz von Antikoagulantien zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und sofort verwendet. Bei allen Werten ist zu beachten, daß sie unter Verwendung von 5 mm Küvetten und nicht wie in der Arbeitsvorschrift gefordert, in 10 mm Küvetten gewonnen wurden.

Zur Messung wurden 0,01 ml Serum und 2,0 ml Aqua dest. in das Testglas gegeben.

Tabelle I

Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Spaltung von Butyrylthiocholin durch Serumcholinesterase (Merckotest); Werte aus zwei Ansätzen mit gleichem Serum und der daraus errechnete Mittelwert.

Extinktions- zunahme	Zeit (sec)		Mittel- wert
	1. Ansatz	2. Ansatz	
0,1	30	34	32
0,2	59	69	64
0,3	69	103	96
0,4	118	137	128
0,5	149	172	161
0,6	179	207	193
0,7	209	242	226
0,8	239	276	258

Wie aus Tabelle I und Abbildung III ersichtlich, erfolgt die enzymatische Spaltung von Butyrylthiocholin durch Serumcholinesterase unter den oben angegebenen Bedingungen in linearer Abhängigkeit von der Zeit. Geringe Abweichungen der der Ergebnisse verschiedener Ansätze mit gleichem Serum können bereits durch minimale Pipettierfehler hervorgerufen werden, da die eingesetzte Serummenge sehr gering ist.

II. Ansätze mit verschiedenen 2-PAM- und Toxogonin- konzentrationen (ohne Serum)

Um das Verhalten von 2-PAM und Toxogonin gegen-
über dem Substrat zu prüfen, wurden dem Testglas
1 ml Oximlösung und 1 ml Aqua dest. zugesetzt.
Die Messungen erfolgten wie oben beschrieben.

Herstellung der Oximlösungen:

10 mg 2-PAM bzw. Toxogonin wurden in 10 ml Aqua
dest. gelöst. Jeweils 1, 2 und 3 ml dieser Lö-
sungen wurden mit Wasser ad 10 ml aufgefüllt.
Die Reaktionsgemische enthielten somit 0,1, 0,2
und 0,3 mg der Reaktivatoren.

Tabelle II

Zeitlicher Ablauf der nichtenzymatischen Spal-
tung von Butyrylthiocholin (Merckotest) durch
2-PAM bzw. Toxogonin. Mittelwerte aus zwei Mes-
sungen.

Extink- tionszu- nahme	Zeit (sec)					
	0,1 mg	2-PAM 0,2 mg	0,3 mg	0,1 mg	Toxogonin 0,2 mg	0,3 mg
0,1	78	39	26	59	28	22
0,2	166	81	53	122	58	44
0,3	262	126	81	192	89	66
0,4	374	177	111	273	123	89
0,5	510	234	142	364	158	113
0,6	679	293	175	463	-	-
0,7	881	356	210	573	-	-

2-PAM und Toxogonin sind wie Serumcholinesterase in der Lage, Butyrylthiocholin unter den oben dargestellten Bedingungen zu spalten (Tab. II; Abb. I und II). Die spektrophotometrische Messung eines Ansatzes mit 2-PAM nach Ablauf der Reaktion ergab ein Extinktionsmaximum bei 405 nm. Die Aktivitäten von Toxogonin und 2-PAM stehen in linearer Abhängigkeit zu ihrer Konzentration im Reaktionsgemisch (Abb. IV); dabei entfaltet Toxogonin eine um etwa 20% stärkere esterolytische Wirkung als 2-PAM; In der Reaktionsgeschwindigkeit entsprechen Ansätze mit 0,01 ml der verwendeten Seren normaler Aktivität in etwa solchen, die 0,3 mg 2-PAM bzw. 0,2 mg Toxogonin enthalten.

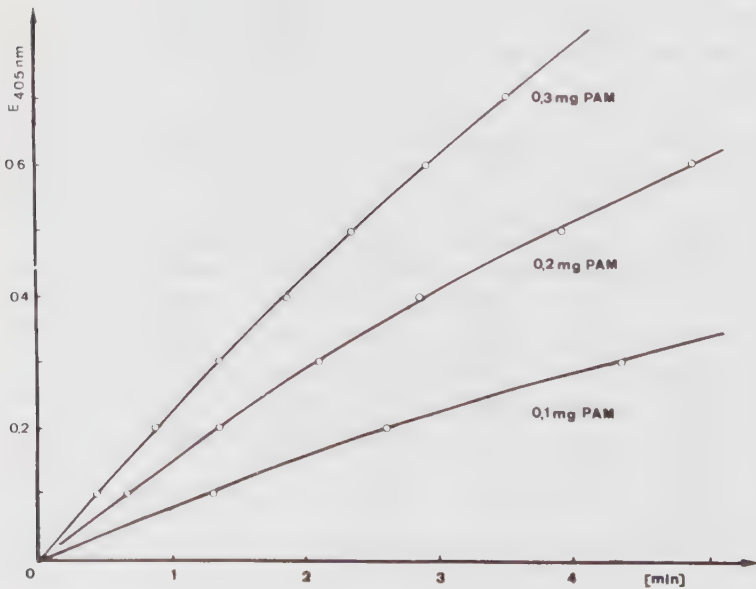


Abb. I : Spaltung von Butyrylthiocholin durch 2-PAM

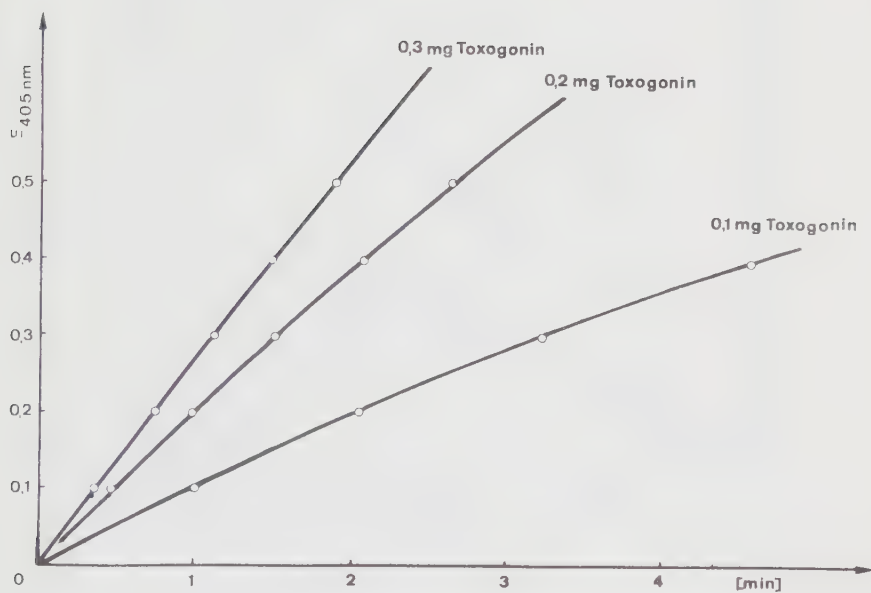


Abb. II : Spaltung von Butyrylthiocholin durch Toxogonin

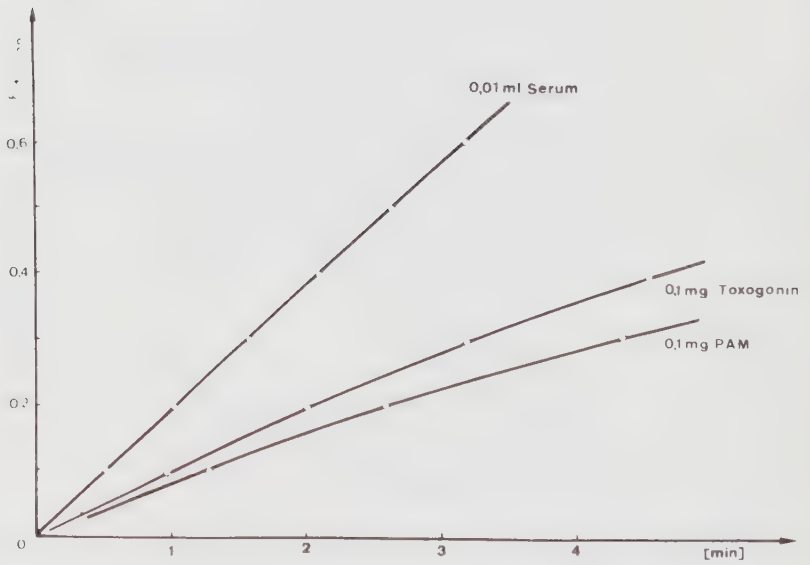


Abb. 111 : Spaltung von Butyrylthiocholin durch Serum, 2-PAM und Toxogonin

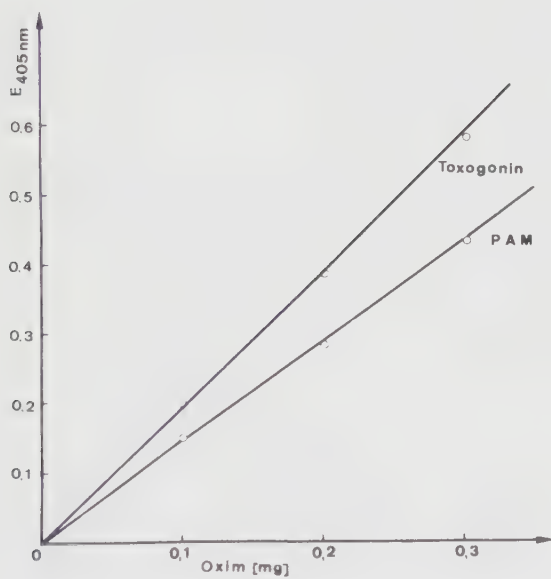


Abb. IV : Spaltung von Butyrylthiocholin durch verschiedene Reaktivatormengen. Messung der Extinktionszunahme nach 2 Minuten

III. Ansätze mit Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin

Um festzustellen, ob sich die Reaktivatoren und das Serum in ihrer Aktivität beeinflussen, wurden auch Messungen von Serum mit 2-PAM bzw. Toxogonin vorgenommen. Es wurden 1 ml Reaktivatorlösung, 0,01 ml Serum und 1 ml Aqua dest. in das Testgläschen gegeben.

Tabelle III

Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Butyrylthiocholin (Merckotest) durch Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin gleichzeitig. Mittelwerte aus zwei Messungen.

Die Mittelwerte für Serum allein sind zum Vergleich aufgeführt.

Extink- tionszu- nahme	Zeit (sec)		
	Serum und 0,1 mg PAM	Serum und 0,1 mg Toxogonin	Serum allein
0,1	22	19	32
0,2	44	39	64
0,3	67	60	96
0,4	91	83	128
0,5	115	106	161
0,6	138	128	193

Wurden dem Testgläschen zugleich Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin zugesetzt, so glich innerhalb der

ersten 90 Sekunden die Gesamtaktivität annähernd der Summe der erwarteten Einzelaktivitäten, sank dann jedoch darunter (Abb. V).

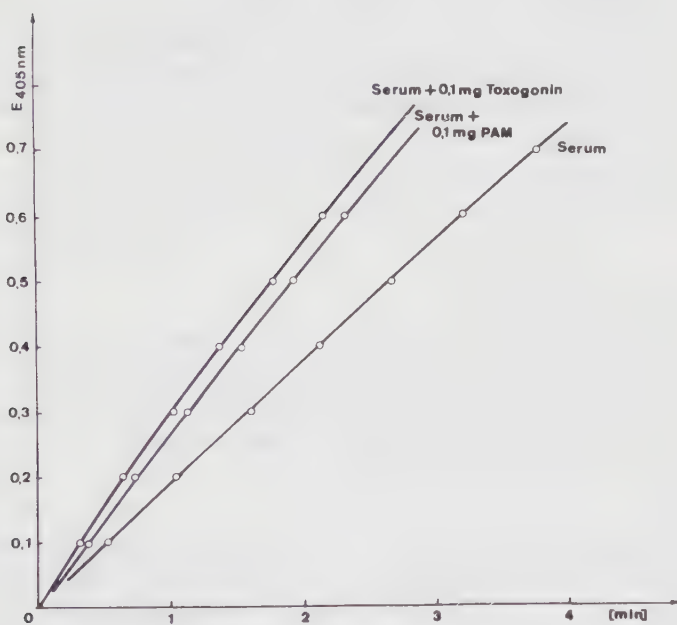


Abb. V : Spaltung von Butyrylthiocholin durch Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin zusammen.

IV. Ansätze mit vergiftetem Serum und 2-PAM bzw. Toxogonin

Sodann wurden Messungen von mit E 600 in vitro vergiftetem Serum unter Zusatz von 2-PAM bzw.

Toxogonin vorgenommen.

Vergiftung des Serums:

1 μ l E 600 wurde in 10 ml Aqua dest. gelöst.
Nach gründlichem Mischen wurden 5 μ l dieser
Verdünnung zu 0,75 ml Serum gegeben.

Die Aktivität des vergifteten Serums allein
nach einstündiger Inkubation mit E 600 bewirk-
te nur noch eine Extinktionszunahme von 0,01 in
vier Minuten. 0,01 ml des vergifteten Serums,
1 ml Reaktivatorlösung und 1 ml Aqua dest. wur-
den in ein Testglas gegeben, die Messung erfolgte
sofort.

Tabelle IV

Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Butyryl-
thiocholin durch E 600-vergiftetes Serum und
2-PAM bzw. Toxogonin und der gleichzeitig ein-
hergehenden Reaktivierung des Enzyms. Mittel-
werte aus zwei Messungen.

Extink- tionszu- nahme	E 600-vergiftetes Serum mit Zusatz von 2-PAM			Toxogonin		
	0,1 mg	0,2 mg	0,3 mg	0,1 mg	0,2 mg	0,3 mg
0,1	69	33	24	47	27	18
0,2	140	68	50	91	54	35
0,5	219	106	75	138	82	54
0,4	300	143	102	186	111	72
0,5	384	148	130	241	138	-
0,6	479	229	160	303	-	-
0,7	589	275	190	360	-	-

Die Messungen mit E 600-vergiftetem Serum (nach einstündiger Inkubation) und 2-PAM bzw. Toxogonin zusammen ergaben eine höhere Aktivität, als die der Summe der verbliebenen Restaktivität und der des Reaktivators entsprechenden, wofür die zur gleichen Zeit verlaufende Reaktivierung des Ferments verantwortlich zu machen ist (Abb. VI und VII). Dementsprechend war die Diskrepanz bei Toxogonin größer als bei 2-PAM.

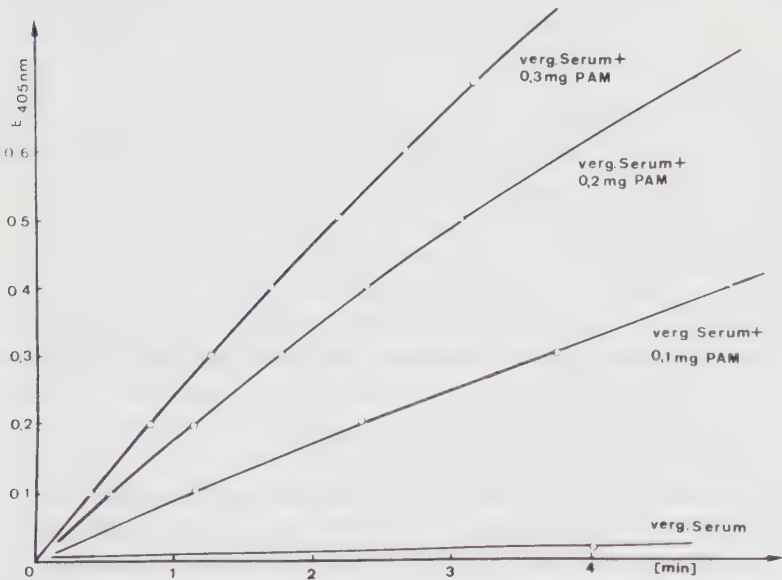


Abb. VI : Spaltung von Butyrylthiocholin durch E-600-vergiftetes Serum und 2-PAM mit gleichzeitiger Fermentreaktivierung.

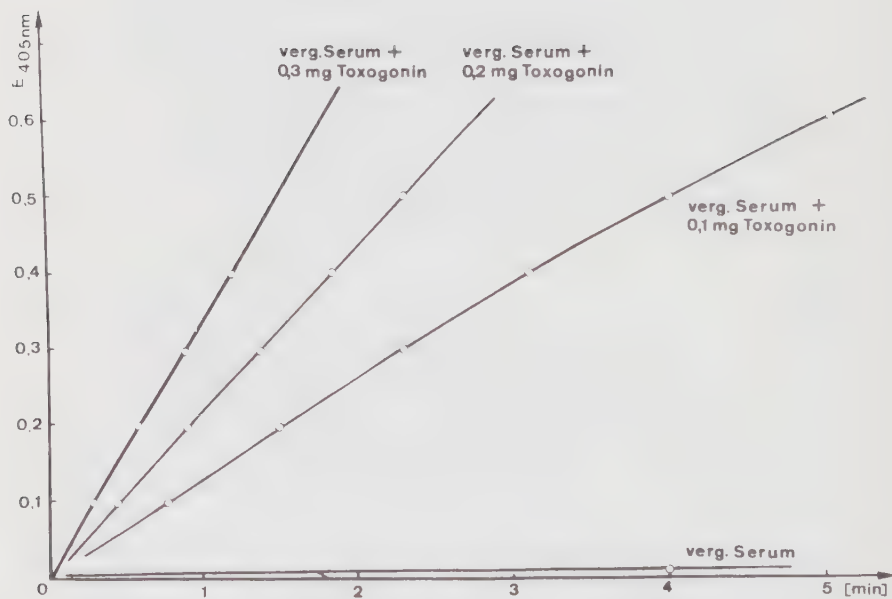


Abb. VII : Spaltung von Butyrylthiocholin durch E 600-vergiftetes Serum und Toxogonin mit gleichzeitiger Fermentreaktivierung.

E) Diskussion

2-PAM und Toxogonin sind in der Lage, Butyrylthiocholin unter den Bedingungen des kinetischen Cholinesterasetests (Merckotest) der Firma Merck zu spalten.

In der Literatur sind als Substrate für die Pseudocholinesterase eine ganze Reihe von Verbindungen mit Säureanhydridcharakter vorgeschlagen worden, deren Verwendung zu Reaktivierbarkeitsmessungen alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase mit 2-PAM und Toxogonin jedoch von ihrem Verhalten den Reaktivatoren gegenüber abhängt.

Geldmacher-von Mallinckrodt und Kaiser (1908) haben eine Zusammenstellung von Reaktionen, bei denen Anhydride und einige organophosphate durch stickstoffhaltige Verbindungen wie Imidazol, Histidin, Pyridin, Hydroxylamin, Hydroxamsäuren, Oxime und Hydroxyiminoaceton gespalten werden. Sie kamen zu dem Schluß, daß nicht nur die genannten organischen Phosphorsäureester, sondern auch o-Nitrophenylbutyrat, dessen Spaltung durch 2-PAM sie nachgewiesen hatten, wie Säureanhydride reagieren. Die experimentellen Befunde für Butyrylthiocholin sprechen dafür, daß diese Verbindung ebenfalls als Anhydrid aufzufassen ist. Auch für die eingangs erwähnten Stoffe sind ähnliche Ergebnisse zu erwarten.

Bergner und O'Neill (1958) entdeckten die Spaltung

von Acetylthiocholin durch 2-PAM. Um weitere Aufschlüsse über die Reaktion zu gewinnen, verfolgten sie den Vorgang nach der Vorschrift von Meyer und Wilbrandt (1954). Sie stellten eine strenge pH-Abhängigkeit fest und schlossen daraus, daß nur das Oximation reagiert, welches im stark basischen Bereich überwiegend, bei pH 5,5 jedoch nur etwa zu 0,1 % vorliegt. Die Autoren empfahlen daher für die Verwendung von Oximen eine Modifikation des Verfahrens von Koelle und Friedenwald (1948) unter Senkung des pH-Wertes auf 5,35 und Verlängerung der Inkubationszeit.

Heilbronn (1959) untersuchte die Wirkung von Imidazol, Serin, Cystein und 2-Methyloxazolin auf die Hydrolyse von Acetylcholin, Acetyl- β -methylcholin, Acetylthiocholin und Acetyl- β -methylthiocholin bei pH 8 und 25°C. Keine der stickstoffhaltigen Verbindungen zeigte Einwirkung auf die Cholinester. Ebenso konnte keinerlei Effekt von Serin und Methyloxazolin auf die Thioester festgestellt werden. Durch Imidazol jedoch wurde die Hydrolyse der Schwefelverbindungen um das Vierfache und durch Cystein um das Fünfzigfache beschleunigt. Weiterhin berichtete Heilbronn, daß zwar Acetyl- β -methylthiocholin durch Pseudocholinesterase hydrolysiert wird, nicht jedoch Acetyl- β -methylcholin.

Bergmann und Mitarbeiter (1958) hatten ebenfalls den katalytischen Effekt von Imidazol auf Acetyl-

thiocholin beschrieben und festgestellt, daß die Hydrolyse von Acetylthiocholin und p-Methoxyphenylacetat etwa in gleichem Maße beschleunigt wird.

Heilbronn (1959) beschäftigte sich auch mit der Hydrolyse von Thiocholinestern durch Cholinesterase. Sie fand, daß die Spaltung von Acetylthiocholin und Acetylcholin durch Acetylcholinesterase in praktisch demselben Maße beschleunigt wird und schätzte die Bedeutung des Unterschiedes im Radius des Sauerstoff- und Schwefelatoms für die elektrophilen Eigenschaften des benachbarten Carbonylkohlenstoffs gering ein. Im Gegensatz dazu stellten jedoch eine Reihe von Autoren einen schnelleren Ablauf der Reaktion fest, wenn Acetylthiocholin statt Acetylcholin als Substrat verwendet wurde (Meyer und Wilbrandt 1954; Koelle und Friedenwald 1949; Bergmann und Mitarb. 1950).

Wilson (1952) brachte eine Aufstellung einiger Substrate nach zunehmendem elektrophilen Charakter des Carbonylkohlenstoffs: Äthylacetat, Äthylchloracetat, Essigsäureanhydrid und Dithiolessigsäure; Acetylcholin und Acetylthiocholin (Wilson und Bergmann 1950 a,b).

In dieser Reihenfolge nimmt die Micheliskonstante für die enzymatische Hydrolyse ab. Dabei haben jedoch Essigsäureanhydrid und Dithiolessigsäure annähernd denselben Wert wie Acetylcholin, obwohl sie keine positive Ladung besitzen, die

die Bildung des Enzymsubstrat Komplexes erleichtert. Dieser Mangel wird offensichtlich durch den elektrophilen Charakter kompensiert.

So ergab sich auch, daß in einer Serie von Cholinesteraseblockern derselben grundlegenden Struktur die Stärke als Inhibitor vom elektrophilen Charakter des Kohlenstoffs abhing (Wilson 1952).

Bergmann und Mitarbeiter (1958) stellten fest, daß die Aktivität im System Aalacetylcholinesterase-Acetylthiocholin zwischen pH 8 und 10,6 keine Änderung erfährt, während sie bei Verwendung von Acetylcholin als Substrat stark abfällt.

Daß Schwefel nicht wie Sauerstoff zur Wasserstoffbrückenbildung neigt, schlossen die Autoren, daß eine solche Bindung zum aktiven Zentrum auszuschließen sei, da die abnehmende Fähigkeit zu ihrer Ausbildung den Aktivitätsverlust im alkalischen Bereich jenseits von pH 8 für das System Acetylcholinesterase-Acetylcholin verursacht.

Es scheint hier der elektrophile Charakter des Sauerstoffs, bzw. des Carbonylkohlenstoffs in der Esterbindung zu genügen, um eine Hydrolyse zu ermöglichen, während bei Substraten von weniger elektrophilem Charakter, vorwiegend aliphatischen Estern wie Acetylcholin, Äthylacetat und Triacetin eine Wasserstoffbrückenbildung zum Sauerstoff

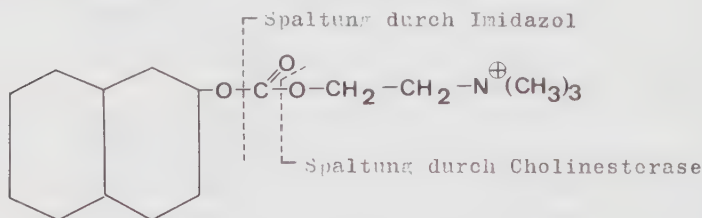
nötig ist, um eine Polarisierung der Esterbindung zu bewirken und somit die Voraussetzung für weitere Reaktionen zu schaffen.

Bruice und Schmir (1956) beobachteten die katalytische Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat durch Imidazol bei pH 8 und 25°C, wohingegen unter den gleichen Bedingungen durch Pyridin, 2,2-Dimethylpyridin und 2,4,6-Trimethylpyridin keine Reaktion erfolgte.

Merrifield und Wooley (1958) studierten die hydrolytische Aktivität synthetischer Histidinpeptide. Als Substrat wurde p-Nitrophenylcarbonat verwendet, da die Beschleunigung der Hydrolyse dieses labilen Esters durch Imidazol und Chymotrypsin den Autoren bereits bekannt war. Als Katalysatoren erwiesen sich L-Seryl-L-histidyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutaminsäure, Poly-L-histidin, Poly-L-histidyl-L-glutaminsäure und Poly-L-histidyl-L-seryl-L-glutaminsäure. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch p-Nitrophenylacetat, nicht jedoch Acetylcholin und Acetylphenylalaninäthylester durch diese Verbindungen gespalten wurden.

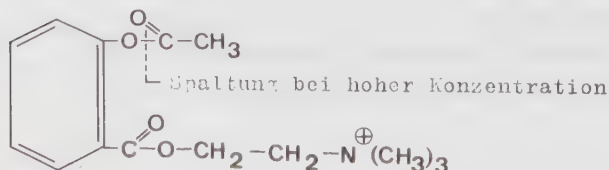
Erdös und Debay (1960) fanden, daß Imidazol und Histidylhistidin wie Cholinesterasen inaktivierend sind, B-Naphthol aus B-Naphthylacetat und B-Carboxynaphthoxycholin in Freiheit zu setzen. Im Diagramm ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zeit und dem Logarithmus des prozentualen Anteils an

ungespaltenem Ester bis zu 95 %. Da Imidazol Acetylcholin aber nicht angreift (Bergmann und Mitarb. 1950), nahmen die Autoren an, daß die Spaltung von β -Carbonaphthoxycholin durch Imidazol und Histidylhistidin an der Naphthoxy-Carbonylbindung durch Cholinesterase jedoch an der Cholin-Carbonylbindung erfolgt.



Spaltung von β -Carbonaphthoxycholin

Augustinsson (1950) fand, daß sich für die Spaltung von Acetylsalicylylcholin durch Acetylcholinesterase nicht die für die enzymatische Hydrolyse von Acetylcholin typische glockenförmige Kurve ergibt, wenn die Aktivität über dem Logarithmus der molaren Substratkonzentration aufgetragen wird. Es wurde daher vermutet, daß bei hohen Acetylsalicylylcholin-konzentrationen nur die Acetyl-Salicylbindung gespalten wird. Bei niedrigen Konzentrationen nahm man die gleichzeitige Hydrolyse der Acetyl-Salicyl- und der Acetyl-Cholinbindung an.



Acetylsalicylylcholin

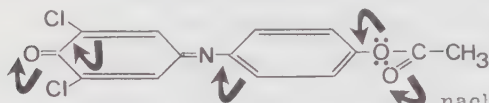
Hieraus ergibt sich der Verdacht auf eine Überlegenheit der Acetyl-Salicylbindung gegenüber der zwischen der Acetyl- und Cholin-Komponente des Moleküls, bezüglich der Spaltbarkeit, da bei der ersteren der die Reaktion begünstigende Einfluß der anionischen Stelle wegen des zu großen Abstandes von dem quaternären Stickstoffatom des Cholins abgeschwächt oder aufgehoben sein muß.

Es scheinen an der Esterbindung mit der phenolischen Alkoholgruppe andere Bedingungen zu herrschen als in aliphatischen Estern.

Die Bindungselektronen der an einem aromatischen System stehenden Hydroxylgruppe beteiligen sich teilweise an der Mesomerie des Kerns, was sich durch Abspaltung eines Protons in der sauren Reaktion gegenüber Lackmus äußert (Beyer 1963). Der Grund dafür liegt in der leichten Verschiebbarkeit der Elektronen des Sauerstoffatoms. Durch Einführen positiver Gruppen wie NO_2 in die o- bzw. p-Stellung lassen diese Effekte sich erheblich steigern.

Tatsächlich beobachteten Kramer und Gamson (1960), daß 2,6-Dihalogenindophenylacetat schneller der enzymatischen Hydrolyse durch Pseudocholinesterase unterliegt als die unsubstituierte Verbindung. Sie nahmen einen induktiven Rückzug von Elektronen in den chinoiden Ring an, der sich über das ganze Molekül bis zum C 4' (13)-Atom auswirkt und

im verstärkt elektrophilen Charakter des Carbo-
nylkohlenstoffs resultiert.



nach Kramer und Gamson

Pullman und Pullman (1959) sahen in der gerin-
geren Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff
den Grund für gesteigerte enzymatische Hydrolyse.
Bergmann (1958) nahm diesen Mechanismus zum An-
laß, das nucleophile Zentrum der esteratischen
Stelle im Enzymmolekül Imidazol zuzuschreiben.
Weiterhin stellten Kramer und Gamson (1960) fest,
daß, wie erwartet, der Effekt der Halogensubsti-
tution für Brom stärker ist, als für Chlor. Berg-
mann und Mitarbeiter (1958) bemerkten, daß sich
die Aktivität von Imidazol gegenüber p-Nitro-
und p-Methoxyphenylacetat und dem unsubstituier-
ten Ester umgekehrt proportional zur Elektronen-
dichte an der Esterbindung verhält. Sie fanden,
daß durch Einführen einer p-Methoxygruppe der
Effekt des Benzolrings abgeschwächt wird.



p-Nitrophenylacetat
(Bergmann und Mitarb. 1958)



p-Methoxyphenylacetat
(Bergmann und Mitarb. 1958)

Bei der Reaktion mit Cholinesterase werden diese Verhältnisse dadurch verschleiert, daß dem elektrophilen Charakter hier eine doppelte Bedeutung zukommt: Große Elektronendichte im Sauerstoff der Esterbindung erleichtert die Wasserstoffbrückenbildung, erhöht aber die zur Spaltung der C-O-Bindung erforderliche Aktivierungsenergie.

So beobachteten die Autoren, daß im p-Nitrophenylacetat beide Wirkungen derart entgegengesetzt gerichtet sind, daß Phenylacetat seinem p-Methoxy- und p-Nitroderivat in der Reaktion mit Cholinesterasen überlegen ist. Andererseits wird verständlich, daß die Aktivität gegenüber Phenylacetat und p-Methoxyphenylacetat im alkalischen Bereich jenseits pH 9 abnimmt, gegenüber p-Nitrophenylacetat jedoch nicht.

Zusammenfassend soll noch einmal herausgestellt werden, daß für einen Teil der hier behandelten aromatischen Ester und Thioester Reaktionen mit stickstoffhaltigen Verbindungen bekannt sind, durch die sie sich gegenüber den Estern aliphatischer Alkohole als eine besondere Gruppe darstellen. Da sie diese Reaktionen mit Anhydriden gemeinsam haben und das Maß der Reaktivität dem in Anhydriden stark ausgeprägten elektrophilen Charakter des Carbonylkohlenstoffs proportional ist, liegt es nahe, sie ebenfalls als Anhydride zu bezeichnen, bzw. ihnen anhydridartigen Charakter zuzusprechen und sie gegenüber "echten" Estern zu unterscheiden.

Für in vitro-Reaktivierungsmessungen mit den von Friedberg und Sakai (1958) vorgeschlagenen 2-PAM-Konzentrationen im Bereich von 10^{-5} molar ist Butyrylthiocholin nicht geeignet.

Zur Verlaufskontrolle einer Antidottherapie genügt es jedoch, die Aktivität zu messen und mit den Werten vor der Behandlung zu vergleichen, ohne nochmals die Reaktivierbarkeit des vergifteten Ferments in vitro zu bestimmen.

Geht man von einer einmaligen i.v.-Injektion von 300 mg 2-PAM bzw. 250 mg Toxogonin aus, so enthielte unmittelbar darauf entnommenes Blut 100 µg 2-PAM bzw. 50 µg Toxogonin pro ml. Entsprechend ihrer Halbwertszeit im Blut (etwa 2 Stunden für 2-PAM-jodid nach Mondritz und Mitarbeitern (1968) und Toxogonin nach Erdmann, Bosse und Franke (1965)) verringerte sich die Konzentration der Oxime mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Injektion. Da bei dem kinetischen Cholinesterasetest (Merckotest) mit Butyrylthiocholin als Substrat nur 0,01 ml Serum verwendet wird, betrüge die eingesetzte Reaktivatormenge unter diesen Umständen maximal 1 µg 2-PAM bzw. 0,5 µg Toxogonin in 2 ml Reaktionsgemisch. Nach Abb. IV würde die durch diese Oximmengen bewirkte Substratspaltung die Ergebnisse nur sehr geringfügig verändern. Lediglich nach mehreren kurz-aufeinanderfolgenden PAM bzw. Toxogoninegaben oder mit Verfahren, die eine größere Menge an Serum erfordern, wäre eine wesentliche Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten. In diesen Fällen können bisher nur echte Ester wie Acetylcholin, Butyrylcholin

der Benzoylcholin verwendet werden.

Im Einzelnen hier nicht wiedergegebene Versuche mit dem Papiertest der Firma Merck (Merckotest, Cholinesterase), ergaben, daß bei Gegenwart von 2-PAM oder Toxogonin allein durch deren saure Reaktion hohe Aktivitäten angezeigt wurden. Die durch enzymatische Hydrolyse aus dem Substrat Acetylcholin freiwerdende Essigsäure reagiert bei dieser Testkombination mit einem Indikatorsystem, das jedoch auch auf die beiden erwähnten Oxime in gleicher Weise anspricht.

Die Pseudocholinesterasebestimmung nach Goedde, Doenicke und Altland (1967) mit Benzoylcholin als Substrat ist für Messungen unter Verwendung von 2-PAM oder Toxogonin nicht geeignet, da bereits geringe Mengen der Oxime bei 240 nm stark absorbieren.

f) Zusammenfassung

Zunächst wurden eine Anzahl von Verfahren zur Cholinesterasebestimmung zusammengestellt, die eventuell in Frage kämen, die Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase mit 2-PAM und Toxogonin zu messen, ohne dabei Acetyl- bzw. Butyrylcholin zu verwenden. Anschließend wurde der kinetische Cholinesterasetest der Firma Merck mit Butyrylthiocholin als Substrat, hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber 2-PAM und Toxogonin geprüft.

Es zeigte sich, daß sowohl 2-PAM als auch Toxogonin in der Lage sind, das Substrat Butyrylthiocholin zu spalten. Weiterhin wurden Versuche über die gegenseitige Beeinflussung von 2-PAM bzw. Toxogonin einerseits und Serum bzw. vergiftetem Serum andererseits unternommen. Butyrylthiocholin eignet sich demnach nicht zur Verwendung bei Reaktivierungsmessungen. Zur einfachen Aktivitätsbestimmung als Verlaufskontrolle einer in vivo-Reaktivierung nach therapeutischen Gaben der Reaktivatoren ist seine Anwendung jedoch unbedenklich, da die dabei im Reaktionsgemisch auftretenden Oximkonzentrationen nicht ausreichen, um die Ergebnisse zu verfälschen.

Abschließend wurde darauf hingewiesen, daß ähnliche Ergebnisse auch mit anderen Thiocholinverbindungen, aromatischen Estern und Anhydriden zu erwarten sind.

Ein weiterer Cholinesterasetest der Firma Merck (Merckotest, Cholinesterase) erwies sich als ebenfalls ungeeignet für Arbeiten mit 2-PAM und Toxogonin, da hierbei das Indikatorsystem hohe Aktivitäten anzeigt, ohne daß das Substrat Acetylcholin gespalten wird.

.) Literatuurverzeichniss

AUGUSTINSSON, K.-B.: Cholinesterases, A Study
in comparative enzymology.
Acta Physiol. Scand. 15, Suppl. 52 (1948)

AUGUSTINSSON, K.-B.: The hydrolysis of noncholine esters by acetylcholin-esterase from human erythrocytes.
Acta Chem. Scand. 4, 984 (1950)

AUGUSTINSSON, K.-B.: Electrophoresis studies on blood plasma esterases. I. Mammalian plasmata.
Acta Chem. Scand. 13, 571 (1959)

BARNETT, R. J.: The distribution of esterolytic activity in the tissues of the albino rat as demonstrated with indoxyl acetate.
Anat. Rec. 114, 577 (1952)

BARNETT, R. J. and A. N. SELIGMAN: Histochemical demonstration of esterases by production of indigo.
Science 114, 579 (1951)

BEARDS, F., C. H. POSTHUMUS, I. v.d. SLUYS and P. A. J. LILJEBLAD: The chemical basis of the "ageing process" of DFP-inhibited pseudochoolin-esterase.
Biochim. Biophys. Acta 34, 576 (1959)

BERGMANN, F.: Zit. KRAMER and GAMSON 1960
Advances in catalysis, Vol X. W. G. Frankenburg,
V. I. Komarewsky and E. K. Rideal (Editors),
Academic Press, Inc., New York, p 130 (1958)

BERGMANN, F., M. WURZEL and E. SHIMONI: Hydrolysis
of anhydrides by esterases.
Nature 171, 744 (1953 a)

BERGMANN, F., M. WURZEL and E. SHIMONI: The enzymic
hydrolysis of acid anhydrides.
Biochem. J. 55, 888 (1953 b)

BERGMANN, F., R. SEGAL, A. SHIMONI and M. WURZEL:
The pH-dependence of enzymic ester hydrolysis.
Biochem. J. 63, 684 (1956)

BERGMANN, F., S. RIMON and R. SEGAL: Effect of pH
on the activity of eel esterase towards different
substrates.
Biochem. J. 68, 493 (1958)

BERGNER A. D. and J. J. O'NEILL: A modification
of the Koelle technique for use with oximes.
J. Histochem. Cytochem. 6, 72 (1958)

BEYER, H.: Lehrbuch der Organischen Chemie,
10. Aufl, S. Hirzel Verlag Leipzig 1963, S. 385

BRUCE, T. C. and G. L. SCHMID: The catalysis of
the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate by imida-

zole and its derivatives.

Arch. Biochem. Biophys. 63, 484 (1956)

CELTHERON, J. W., M. MITCHARD and N. J. HARPER:

The possible biological function of pseudocholinesterase.

Nature 199, 1000 (1963)

CORSON, S. and S. J. HOLT: Studies in enzyme cytochemistry. IV. Kinetics of aerial oxidation of indoxyl and some of its halogen derivatives.

Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B 148, 506 (1958)

CLÉVIER, M. and L. F. BÉLANGER: Simple method for histochemical detection of esterase activity.

Science 122, 556 (1955)

DAVIS, B. J.: Histochemical demonstration of erythrocyte esterase.

Proc. Soc. Exp. Biol 101, 90 (1959)

DEBZ, F. A.: On the histochemistry of the myoneural junction.

Brit. J. Exp. Path. 34, 329 (1953)

ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES, Jr. and R. M. FLATELSTONE: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochem. Pharmacol. 7, 88 (1961)

ERDMANN, W. D., I. BOSSÉ und I. FRANK: Zur Resorption und Ausscheidung von Toxogonin nach in-

tramuskulärer Injektion am Menschen.

Dtsch. med. Wschr. 90, 1436 (1965)

ERDÖS, E. G. and C. R. DEBAY: Hydrolysis of β -carbonaphthoxycholine.

Biochim. Biophys. Acta 39, 551 (1960)

FRIEDBERG, K. D. und F. SAKAI: Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid, PAN).

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

FUNNELL, H. D. and W. T. OLIVER: Proposed physiological function for plasma cholinesterase.

Nature 208, 689 (1965)

GAL, E. M. and E. ROTH: Spectrophotometric methods for determination of cholinesterase activity.

Clin. Chim. Acta 2, 316 (1957)

GARRY, P. J. and J. I. ROUTH: A micro method for serum cholinesterase.

Clin. Chem. 11, 91 (1955)

GATTERDAM, P. E., J. E. CASIDA and D. W. STOUTAMIRE: Relation of structure to stability, antierase activity and toxicity with substituted vinyl phosphate insecticides.

J. Econ. Entomol. 52, 270 (1959)

GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M. und I. KAISER: Die

Verwendung von o-Nitrophenylbutyryl als Fehlerquelle bei der Messung der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM.

Z. Klin. Chem. 6, 141 (1968)

GOEDDE, H. W., K. OMOTO, H. RITTER und H. BAITSCH:
Zur formalen Genetik der Pseudocholinesterasen.
Untersuchungen von 408 Familien.
Humangenetik 1, 1 (1964)

GOEDDE, H. W., K. ALTLAND und K. BROSS: Genetik
und Biochemie der Pseudocholinesterasen.
Dtsch. med. Wschr. 88, 2510 (1963)

GOEDDE, H. W., A. DOENICKE und K. ALTLAND: Pseudocholinesterasen, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1967)

GOMORI, G.: The histochemistry of esterases.
Int. Rev. Cytol. 1, 323 (1952)

GOMORI, G.: Histochemistry of human esterases.
J. Histochem. Cytochem. 3, 479 (1955)

GREEN, A. L. and B. SAVILLE: The reaction of oximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin).
J. Chem. Soc. (London) 1956/III, 3887

GREEN, A. L., G. L. SAINSBURY, B. SAVILLE and M. STAINFIELD: The reactivity of some nucleophilic reagents with organophosphorous anticholinesterases.

J. Chem. Soc. (London) 1958/II, 1583

GÜNTHER, J. und D. RUFF-SONDERMEIER: Kolorimetrische Messung der Indoxylspaltung durch Serumcholinesterase im sichtbaren Bereich.
Naturw. 52, 540 (1965)

HACKLEY, B. E., Jr., R. PLAPINGER, M. STOLBERG and T. WAGNER-JAUREGG: Acceleration of the hydrolysis of organic fluorophosphates and fluorophosphonates with hydroxamic acids.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 3651 (1955)

HARRIS, H. and E. B. ROBSON: Screening tests for the "atypical" and "intermediate" serum cholinesterase types.
Lancet 2, 218 (1963)

HEILBRONN, E.: Hydrolysis of carboxylic acid esters of thiocholin and its analogues.
Acta Chem. Scand. 13, 1547 (1959)

HESTRIN, S.: The reaction of acetylcholin and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application.
J. Biol. Chem. 180, 249 (1949)

HOFSTEDE, B. H. J.: Spectrophotometric determination of esterases.
Science 114, 128 (1951)

HOBBIGER, E. E.: The hydrolysis of indoxyl esters by rat esterases.

Biochem. J. 67, 600 (1957)

HOLT, S. J.: A new principle for the histochemical localization of hydrolytic enzymes.

Nature 169, 271 (1952)

HOLT, S. J.: The value of fundamental studies of staining reactions in enzyme histochemistry, with reference to indoxyl methods for esterases.

J. Histochem. Cytochem. 4, 541 (1956)

HOLT, S. J. and F. J. Withers: Cytochemical localization of esterases using indoxyl derivatives.

Nature 170, 1012 (1952)

HURD, CH. D. and L. BAUER: A novel rearrangement of hydroxamic acids using sulfonyl chlorides.

J. Amer. Chem. Soc. 76, 2791 (1954)

JANDOLF, B. J.: Chemical reactions of nerve gases in neutral solution, I. Reactions with hydroxylamine.

J. Amer. Chem. Soc. 78, 5686 (1956)

KAUFMAN, K.: Serum cholinesterase activity in the normal individual and in people with liver disease.

Ann. Intern. Med. 41, 553 (1954)

KREISER, E.: Über die medikamentöse Beeinflussung der Cholinesterase.

Klin. Wschr. 17, 1811 (1938)

KLAUS, E. und H. RENSCHLER: Essentielle Hypocholinesterasämie.

Klin. Wschr. 38, 439 (1960)

KNEDEL, M und R. BÜTTGER: Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudocholinesterase (Acylcholin-acylhydrolase 3. 1. 1. 8.).

Klin. Wschr. 45, 325 (1967)

KOELLE, G. B. and J. S. FRIEDENWALD: A histochemical method for localizing cholinesterase activity.

Proc. Soc. Exp. Biol. 70, 617 (1949)

KONDRITZER, A. A., P. ZVIRBLOS, A. GOODMAN and S. H. PAPLANUS: Blood plasma levels and elimination of salts of 2-PAM in man after oral administration.

J. Pharm. Sci. 57, 1142 (1968)

KRAMER, D. N. and R. M. GAMSON: Colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Anal. Chem. 30, 251 (1958)

KRAMER, D. N. and R. M. GAMSON: Studies of the fine structure of the isometric indophenyl esters: Biochemical implications.

J. Biol. Chem. 235, 1783 (1960)

LANG, W. und G. INTSESULOGLU: Zur Methodik und klinischen Bedeutung der Cholinesterasebestimmung im Serum.

Klin. Wschr. 40, 312 (1962)

MAIR, A. R., K. E. MILES and P. E. BRAID: The determination of human serum cholinesterase with o-nitrophenyl butyrate.
Biochem. J. 78, 769 (1961)

MC. COLE, R. B., R. V. LA MOTTA and H. J. WETSTONE: Procedure for detecting atypical serum cholinesterase using o-nitrophenylbutyrate as substrate.
Clin. Chem. 11, 645 (1965)

MC OSKILL, D. E. and L. J. DANIEL: A colorimetric micro method for the determination of cholinesterase.
Arch. Biochem. 79, 1 (1959)

MERRIFIELD, R. B. and D. W. WOOLLEY: Esterase activity of synthetic histidine peptides.
Fed. Proc. 17, 275 (1958)

MEYER, A. und W. WILBRANDT: Zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterasen im menschlichen Blute.
Helv. physiol. pharmacol. Acta 12, 206 (1954)

NACHLAS, M. M. and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of esterase.
J. Nat. Cancer Inst. 2, 415 (1949)

PULLMAN, A. and B. PULLMAN: Zit. KRAMER and GELSON 1960.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 45, 1572 (1959)

RAVIN, H. A., K.-C. TSOU and A. M SELIGMAN:
Colorimetric estimation an histochemical de-
monstration of serum cholinesterase.

J. Biol. Chem. 191, 843 (1951)

RIDER, J.A., H. C. MOELLER and K. P. DU BOIS:
Colorimetric measurement of serum cholinesterase.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76, 427 (1951)

RUBIN, A. A., J. MERSHON, M. E. GRELIS and I. I.
A. TABACHNICK: A spectrophotometric method for
assaying anticholinesterase activity.
Fed. Proc. 16, 333 (1957)

SAILER, S. und H. BRAUNSTAINER: Über eine neue,
sehr einfache Methode zur Bestimmung der Serum-
cholinesteraseaktivität und ihre klinische Be-
deutung.
Klin. Wschr. 37, 986 (1959)

SCHULZE, G.: Enzyme. In: Biochemische Befunde
in der Differentialdiagnose innerer Krankheiten
Hersgb. R. Schoen und H. Südhof. Thieme Stutt-
gart (1960)

SIMPSON, N. E. and W. KALOW: Comparison of two
methods for typing of serum cholinesterase and
prevalence of its variants in a Brazilian popu-
lation.
Amer. J. Hum. Genet. 17, 156 (1965)

SÖCKER, H., Enzymatische Methoden. In: Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte, Bd. II. Hrsgeb. E. Graf und Fr. Preuss. Van den Hoek und Rupprecht, Göttingen (1965)

TABACHENICK, I. I. A.: A rapid spectrophotometric assay of purified cholinesterase.
Biochim. Biophys. Acta 21, 580 (1956)

TABACHENICK, I. I. A., J. MERSHON, M. E. GRELIS and A. A. RUBIN: A rapid spectrophotometric assay of cholinesterase inhibitors.
Arch. int. Pharm. 114, 351 (1958)

UNDERHAY, E. E.: The hydrolysis of indoxyl esters by esterases of human blood.
Biochem. J. 66, 383 (1957)

URTEL, I.: Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immunélectrophorèse en gelose.
Ann. Inst. Pasteur 101, 105 (1961)

WAGNER-JAUREGG, T.: Experimentelle Chemotherapie von durch phosphorhaltige Anti-Esterasen hervorgerufenen Vergiftungen.
Arzneimittel-Forsch. (Aulendorf) 6, 194 (1956)

WAGNER-JAUREGG, T. and B. E. HACKLEY Jr.: Model reactions of phosphorous-containing enzyme inactivators. III. Interaction of imidazole, pyri-

dine and some of their derivatives with dialkyl
J. Amer. Chem. Soc. 75, 2125 (1953)

WEBER, H.: Rasche und einfache Ultramicromethode
zur Bestimmung der Serurcholinesterase.
Dtsch. med. Wschr. 91, 1927 (1966)

ZELMER, A. und A. FICET: Beckmann'sche Umlage-
rung durch Benzolsulfonsäurechlorid bei Gegen-
wart von Alkali oder Pyridin.
Ber. dtsch. chem. Ges. 37, 4295 (1904)

WETSTONE, H. J., M. S. MORELLAN and R. B. MC COMB:
Genetic control of the quantitative activity of
a serum enzyme in man.
JAMA 192, 1007 (1965)

WILSON, I. B.: Mechanism of hydrolysis. II. New
evidence for an acylated enzyme as intermediate.
Biochim. Biophys. Acta 7, 320 (1951)

WILSON, I. B.: Acetylcholinesterase. XII. Further
studies of binding forces.
J. Biol. Chem. 197, 215 (1952)

WILSON, I. B.: The Reactivation of acetylcholin-
esterase inhibited by tetraethylpyrophosphate
and diisopropylfluorophosphate.
J. Amer. chem. Soc. 77, 4286 (1955)

ZACKS, S. I. and J. M. BLUMBERG: Simple and inexpensive anticholinesterase detectors for field use.

Milit. Med. 129, 1084 (1964)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit in seinem Institut arbeiten zu dürfen.

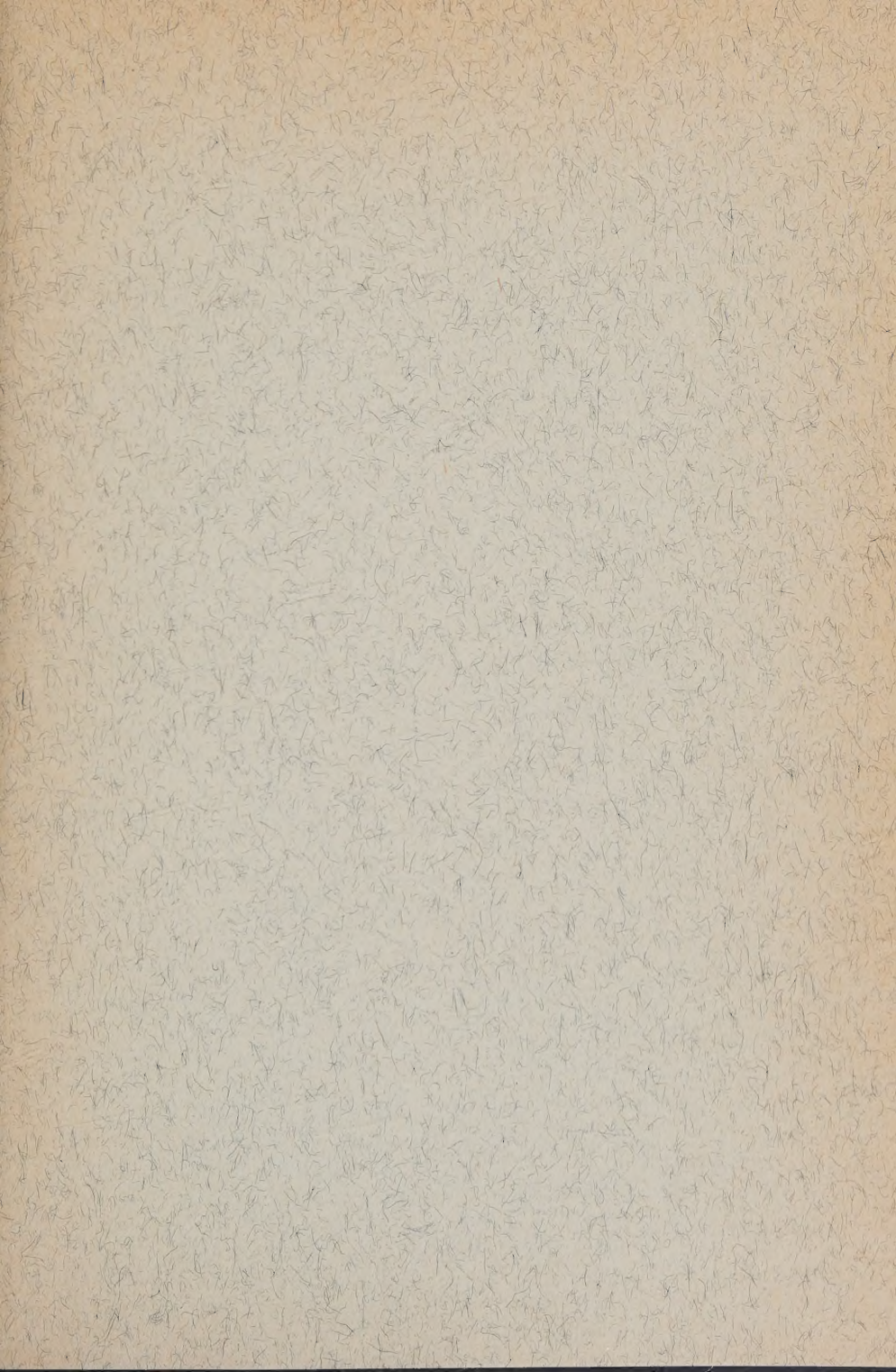
Meinen Dank spreche ich an dieser Stelle auch Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-von Mallinckrodt aus für die Überlassung des Thomas, für ihren Rat und ihre Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 11. 7. 1944 wurde ich, Hanns-Joachim Urbach, als Sohn des Stabsarztes Hans Urbach und seiner Ehefrau Rose-Anita, geborene Blanck in Dresden geboren.

Seit 1946 in Soltau/Hann. wohnhaft, trat ich 1950 in die dortige Volksschule ein, 1954 in die Städtische Mittelschule. Nach der Umsiedlung meiner Eltern nach Immenreuth/Opf. besuchte ich von Oktober 1958 an die Oberrealschule Marktredwitz und erhielt dort am 22. 7. 1964 das Zeugnis der Reife. Nach meinem Wehrdienst vom 1. 10. 64 bis zum 25. 11. 64 begann ich im Sommersemester 1965 das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg, an der ich im November 1967 die ärztliche Vorprüfung und am 18. 1. 1971 das Staatsexamen bestand.

Erlangen, Februar 1971





Buchdruckerei Ludwig Müller Erlangen Fahrstraße 5